

Cell mediated immunity toward kidney cells : an experimental study in dogs

Citation for published version (APA):

Vegt, P. A. (1983). *Cell mediated immunity toward kidney cells : an experimental study in dogs*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19831006pv>

Document status and date:

Published: 01/01/1983

DOI:

[10.26481/dis.19831006pv](https://doi.org/10.26481/dis.19831006pv)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

To achieve a successful kidney transplantation, many problems in respect to the immunological phenomenon of rejection have to be solved. Appropriate selection of donor and recipient can diminish the number of antigens to which a rejection can be initiated. Performing crossmatches of the recipients serum with donor antigens before transplantation can detect a state of pre-sensitization of the recipient toward donor antigens. Pre-sensitization is likely to be associated with an acute rejection in a number of cases, pre-transplant monitoring is therefore of great clinical importance.

Donor recipient selection is determined by matching for leucocyte antigens, which belong to the Human Leucocyte Antigen (HLA) system. It is well established that also non-HLA antigen systems exist in man. The involvement of non-HLA antigens in kidney transplantation has recently been proven. Antibodies directed toward endothelial antigens of the donor in patients rejecting their kidneys have been detected, while these antibodies were absent in kidneys removed after transplantation for non-immunological reasons.

The existence of non-leucocyte antigens and their involvement in kidney transplantation were a motive to study antigens on canine kidney epithelial cells. The studies on cell mediated immunity toward canine kidney epithelial cells, which form the base of this thesis are presented in four publications.

The first publication as presented in chapter 4 describes a study on cell mediated cytotoxicity toward kidney target cells. Monolayer adsorption studies have been performed to study whether CTL recognize identical antigens on kidney epithelial cells as on PHA stimulated lymphoblasts. Cytotoxicity toward PHA stimulated lymphoblasts has been reduced by leucocyte and kidney cell monolayers, whereas leucocyte monolayers reduced cytotoxicity toward kidney epithelial cells for only 40%. These results and cold target inhibition data strongly suggest that kidney epithelial cells present antigens to which a selective population of CTL is directed. It is discussed whether the relevant antigens on the kidney cells are organ specific antigens or MHC antigens not present on PHA blasts.

Chapter 5 deals with the question whether antigens on kidney epithelial cells are capable to induce proliferation of allogeneic or syngeneic lymphocytes. In the in vitro model of the mixed kidney cell leucocyte culture, the kidney cells appeared to be strong stimulators in an allogeneic stimulator responder combination. Maximal proliferation responses have been observed at a S : R ratio of 1:20. At this low S : R ratio no stimulation was observed in a mixed leucocyte reaction. Lymphocyte stimulation has not been observed in mixed kidney leucocyte cultures between MHC identical closely bred animals.

To investigate whether the kidney epithelial cells were the true stimulators in the mixed kidney leucocyte cultures, contamination with other cells had to be excluded carefully. The use of a selective medium, containing D-valine instead of L-valine permitted only the growth of epithelial cells. Fibroblastoid cells which are unable to convert the D-valine into the essential L-valine are not capable to survive in a D-valine containing medium. Intracellular immunofluorescence with anti-factor VIII anti-serum showed that contamination of the cell cultures with endothelial cells was absent. Contamination with dendritic cells could be excluded by culture of the kidney cells for at least 15 days before they were used as stimulators. It has been concluded that kidney epithelial cells are strong stimulators for allogeneic lymphocytes; the nature of the antigens responsible for this stimulation has been discussed.

The ability of kidney cells to induce cytotoxic T lymphocytes (CTL) after allogeneic stimulation has been studied and described in the third publication. Generation of CTL, cytotoxic for both kidney cells and PHA stimulated lymphoblasts, has been observed in mixed kidney cell leucocyte cultures. Lymphocyte stimulation and generation of CTL occurred in the MKLC at lower stimulator responder ratios than in the mixed lymphocyte culture. These data are in accordance with those of Steinmuller, who observed generation of CTL in mixed murine tail epidermal cell lymphocyte cultures. The results are not in agreement with Lafferty's model of 'immunogenicity of foreign tissues' because in our experiments CTL are generated in the absence of lymphoid cells in the stimulator cell fraction.

The first three publications clearly showed that canine kidney epithelial cells are useful for in vitro studies toward non-MHC antigens. Their possible use in studies on cell mediated immunity after transplantation has been investigated in chapter 7.

An adsorption model in which primed lymphocytes were adsorbed on stimulator leucocyte monolayers has been used to study the affinity of CTL and their precursors toward donor antigens. The results of immunoabsorption assays performed during the generation of CTL clearly show that primed precursor CTL do lack affinity toward stimulator type antigens. When this is extrapolated to the clinical situation, it might implicate that primed precursor CTL do not adhere toward donor antigens in the grafted kidney. Precursor CTL are thus expected to circulate after transplantation during cellular rejection and can be detected in peripheral blood. This is of great clinical importance since the detection of CTL in peripheral blood still gives inconsistent results, probably due to the homing properties of the CTL in the grafted kidney.

In a canine kidney transplantation model in which no immunosuppression was given, CTL and their precursors were studied in peripheral blood and thoracic duct lymph during first set rejection episodes. Circulating CTL could only be detected marginally in dogs during a severe first set rejection episode. A short restimulation of leucocytes from the identical samples of peripheral blood and thoracic duct lymph revealed that they were rich in primed precursor CTL in all dogs during this rejection episode. This finding supports the data on the involvement of CTL in cellular allograft rejection. The canine kidney epithelial cells of the donor kidney served as sensitive targets for this cell mediated cytotoxicity after transplantation.

These studies show that kidney epithelial cells carry antigens which are target antigens for in MLC generated cytotoxic T cells and not present on PHA stimulated lymphoblasts. Kidney epithelial cells were able to stimulate allogeneic lymphocytes in lower stimulator responder ratios than leucocyte stimulator cells. A stimulation in a MKLC between MHC identical animals however was not observed. This implies that for lymphocyte proliferation by kidney epithelial cells still a difference in MHC antigens is required. When kidney epithelial cells are used for in vitro monitoring after transplantation they can detect a cellular reactivity toward lymphoid and non-MHC antigens during rejection episodes.

Samenvatting

Voor het doen slagen van een niertransplantatie moeten vele problemen op het gebied van de immunologische afweer worden opgelost. Een juiste selectie van donor en ontvanger leidt tot een vermindering van het aantal transplantatie-antigenen, die bij de ontvanger een afstotingsreactie kunnen induceren. Kruisproeven van ontvangerserum met donorlymfocyten kunnen circulerende antilichamen bij de ontvanger aantonen, die gericht zijn tegen de antigenen van de donor. Gezien het feit dat sensibilizatie van de ontvanger tegen donorantigenen in een aantal gevallen gepaard gaat met een versnelde afstotingsreactie is het van groot belang potentiële niertransplantatiepatiënten op de aanwezigheid van dergelijke tegen donorantigenen gerichte antilichamen te onderzoeken.

Het selecteren van de donor en ontvanger gebeurt aan de hand van antigenen welke behoren tot het Humane Leucocyten Antigeen (HLA-) systeem. Recent is aangetoond dat ook andere antigenen, welke niet tot het HLA-systeem behoren, een rol spelen bij de afstoting van niertransplantaten. Bij patiënten die hun nier hadden afgestoten werden antilichamen aangetoond, welke gericht waren tegen antigenen aanwezig op de endotheelcellen van de ontvangen nier. Deze antilichamen werden niet gevonden in de nieren van mensen bij wie de getransplanteerde nier om andere redenen moest worden verwijderd.

De aanwezigheid van deze antilichamen gericht tegen niet tot het HLA-systeem behorende antigenen bij afstotingsreacties van de nier was aanleiding tot het onderzoek naar de antigenen die aanwezig zijn op nierepitheelcellen. De cellulaire immuniteit tegen antigenen op nierepitheelcellen werd onderzocht. De resultaten van dit onderzoek zijn beschreven in 4 publicaties, welke de kern vormen van dit proefschrift.

De eerste publicatie beschrijft een model waarin de cellulaire cytotoxiciteitsreacties tegen *in vitro* gekweekte hondenierepitheelcellen worden bestudeerd. Met behulp van cellulaire immuun adsorptietechnieken werd onderzocht of er op nierepitheelcellen target-antigenen aanwezig zijn welke als zodanig door cytotoxische T-lymphocyten herkend kunnen worden. Tevens werd bestudeerd of deze antigenen ook op hondeleucocyten aanwezig zijn.

Na adsorptie van de effectorcellen (= cytotoxische T-lymphocyten) op leucocyten- en niercelmonolayers verdween de cytotoxiciteit voor PHA-gestimuleerde lymphocyten vrijwel geheel. Leucocyten-monolayers waren echter niet in staat alle effectorcellen uit te adsorberen, welke gericht waren tegen target-antigenen op de niercellen. Hieruit werd geconcludeerd dat er een subpopulatie van cytotoxische T-cellen bestaat welke antigenen herkent op niercellen, die niet aanwezig zijn op leucocyten. Dit werd bevestigd met behulp van cytotoxiciteitsremmingstesten. In de

discussie wordt ingegaan op de vraag of deze antigenen behoren tot het MHC-complex of dat er sprake is van weefsel-specifieke antigenen.

In de tweede studie werd onderzocht of nierepitheelcellen in staat zijn tot het stimuleren van allogene en syngene leucocyten. Hiervoor werd het model van de gemengde niercel-leucocytenkweek gebruikt. Gemengde kweken van niercellen en leucocyten met verschillende verhoudingen tussen de stimulator en responder toonden aan dat de nierepitheelcellen in significant lagere aantallen dan leucocyten, stimulatie gaven van allogene leucocyten. Er werd geen stimulatie van MHC-identieke leucocyten gevonden door nierepitheelcellen. Een belangrijk aspect van leucocytenstimulatie door niet-lymfoïde cellen is de eventuele verontreiniging van deze niet-lymfoïde stimulatorcellen met andere celtypen. Om deze mogelijkheden uit te sluiten werd er uitgebreid onderzoek gedaan naar de morfologische en functionele eigenschappen van de nierepitheelcellen, welke gebruikt werden voor de stimulatieproeven.

Verontreiniging met endotheelcellen kon worden uitgesloten door middel van immunofluorescentie met antifactor-VIII antiserum. Dit reageert specifiek met endotheelcellen en de stimulator-celsuspensies bevatten geen cellen met significante immunofluorescentie. Het gebruik van een speciaal kweekmedium waarin het essentiële aminozuur L-valine was vervangen door D-valine, voorkwam de groei van fibroblasten in de nierepitheelcelkweken. De aanwezigheid van dendritische cellen, welke bekend staan om hun sterk leucocyten-stimulerende eigenschappen, kon worden uitgesloten door de nierepitheelcellen minimaal twee weken te kweken voordat ze gebruikt werden als stimulatorcellen.

De mogelijkheid dat nierepitheelcellen behalve lymphocyten-proliferatie ook het ontstaan van cytotoxische T-lymphocyten kunnen induceren, werd onderzocht in een studie welke in hoofdstuk zes wordt beschreven. Stimulatie en inductie van cytotoxische T-cellen vond plaats in gemengde nierepitheelcel-leucocytenkweken. Een lagere stimulator-responder celverhouding dan in de conventionele gemengde leucocytenkweken leidde tot optimale generatie van CTL.

Uit het voorgaande is duidelijk gebleken dat de hondenierepitheelcellen zich goed lenen voor het bestuderen van cellulaire afweerreacties tegen niet door het MHC-gecodeerde antigenen.

Hoofdstuk zeven beschrijft een in vitro studie naar affiniteit van gestimuleerde precursor-cytotoxische T-cellen voor stimulator-antigenen. Tevens wordt in een in vivo transplantatiemodel de bruikbaarheid van de hondeniерcel voor monitoring-doeleinden onderzocht. Directe cytotoxiciteit kon slechts minimaal worden aangetoond. Wel kon door middel van restimulatie worden aangetoond dat er precursor-cytotoxische T-cellen circuleerden tijdens de afstotingsreactie. Dit werd in alle honden gevonden. Doordat in dit monitoringmodel nierepitheelcellen van de donorhond werden gebruikt voor het aantonen van de cellulaire afweer, kon met behulp van de restimulatiestudie de aanwezigheid van een cellulaire reactie tegen zowel lymfoïde als orgaanspecifieke antigenen worden aangetoond.

De onderzoeken welke ten grondslag lagen aan dit proefschrift hebben aangetoond dat de nierepitheelcellen van de hond zeer geschikt zijn voor het bestuderen van

cellulaire immuniteit tegen orgaanspecifieke antigenen. De nierepitheelcellen bezitten antigenen die door cytotoxische T-cellen herkend worden. Tevens kunnen nierepitheelcellen leucocyten stimuleren tot proliferatie in een gemengde niercel-leucocytenkweek. Ook werden in deze niercel-leucocytenkweeken cytotoxische T-cellen gestimuleerd. Het gebruik van nierepitheelcellen bij de immunologische monitoring na transplantatie geeft de mogelijkheid cellulaire reactiviteit tegen lymphoïde als ook tegen orgaanspecifieke antigenen aan te tonen.